我国粘虫种群的微卫星位点筛选及遗传多样性分析

李梅梅#，李伯辽#，仵均祥*，许向利*

（西北农林科技大学植物保护学院，旱区作物逆境生物学国家重点实验室，陕西杨凌 712100）

摘要：【目的】筛选适用于我国粘虫 *Mythimna separata* 种群遗传学研究的微卫星位点，从分子水平揭示粘虫种群的遗传多样性。【方法】利用已报道的微卫星标记及本实验室粘虫转录组测序的SSR 序列，采用 PCR 产物荧光标记与自动扫描分型方法，分析各位点在我国河南、陕西、山西 3 个省份的 7 个粘虫地理种群 200 头试虫中的扩增稳定性和多态性。【结果】7 个粘虫地理种群有 7 个位点能稳定扩增且具有较高的多态性。这 7 个位点等位基因丰富度(*Ar*)为 4.167 ~12.402，观测杂合度(*Ho*)平均为 0.640，期望杂合度(*He*)平均为 0.752，多态信息含量(*PIC*)为 0.547 ~0.884；各位点均存在无效等位基因且偏离哈迪-温伯格平衡，所有成对位点不存在显著连锁不平衡情况。【结论】从来自河南、陕西、山西的 7 个不同粘虫地理种群中成功筛选了 7 个能稳定扩增的 SSR 位点，且在这 7 个不同的粘虫地理种群中均具有较高的多态性，可用于我国粘虫种群遗传结构研究。粘虫不同地理种群间基因交流频繁，基因交流阻止了由遗传漂变引起的群体间分化，不同地理种群间遗传分化很低甚至不存在遗传分化。

关键词：粘虫；微卫星标记；扩增稳定性；遗传多样性；遗传分化；基因流

中图分类号：Q969　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2018)06-0712-09

Screening of microsatellite loci and the genetic diversity analysis of *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in China

LI Mei-Mei#, LI Bo-Liao#, WU Jun-Xiang*, XU Xiang-Li* (State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】This study aims to acquire microsatellite loci available for studying the population genetics of the oriental armyworm, *Mythimna separata* in China and to further uncover the genetic diversity of its geographical populations from a molecular perspective.【Methods】Based on microsatellite markers which had been previously reported in public and the simple sequence repeats (SSRs) from our laboratory transcriptome of *M. separata*, the stability of amplification and polymorphism of these microsatellite loci were analyzed based on 200 individuals sampled in seven geographical populations from Henan, Shaanxi and Shanxi in China. The PCR products of SSRs were labeled fluorescently and scanned automatically.【Results】Seven microsatellite loci were amplified stably in samples of seven geographical populations of *M. separata* and possessed high polymorphism. The allele richness (*Ar*) of the seven microsatellite loci was between 4.167 and 12.402, the average observed heterozygosity (*Ho*) and expected heterozygosity (*He*) were 0.640 and 0.752, respectively, and the polymorphic information

基金项目：国家公益性行业(农业)科研专项(201403031)；国家“十三五”重点研发专项(2017YFD0201807)

作者简介：李梅梅，女，1992 年 8 月生，甘肃天水人，博士研究生，研究方向为农业害虫综合治理，E-mail：1451753889@qq.com；李伯辽，男，1990 年 2 月生，陕西宝鸡人，博士研究生，研究方向为农业害虫综合治理，E-mail：libl19901990@gmail.com

#共同第一作者 Authors with equal contribution

*通讯作者 Corresponding authors, E-mail：junxw@nwsuaf.edu.cn；xuxiangli@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received：2017-12-21；接受日期 Accepted：2018-01-12

content (*PIC*) ranged from 0.547 to 0.884. The seven loci had null allele and deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. No significant linkage disequilibrium existed in pairwise loci. 【Conclusion】Seven microsatellite loci were successfully screened from seven geographical populations of *M. separata* from Henan, Shaanxi and Shanxi, and they show high polymorphism among these geographical populations and can be used in genetic structure research of this insect. In addition, frequent gene flow occurs in these populations, which prevents population differentiation caused by genetic drift. Moreover, fairly low even no pairwise population differentiation occurs in these populations.

Key words: *Mythimna separata*; microsatellite marker; amplifying stability; genetic diversity; genetic differentiation; gene flow

粘虫 *Mythimna separata* (Walker)又称东方粘虫,是我国农作物上一种典型的季节性远距离南北往返迁飞危害的重大农业害虫(李光博等, 1964; 江幸福等, 2014a)。我国除新疆未见报道外,在其他地方均可造成危害。近年来,在我国玉米、小麦和水稻等粮食作物主产区频繁成灾,危害严重(曾娟等, 2013; 姜玉英等, 2014; 程登发和赵中华, 2016; 周靖华等, 2017)。国外广布于除我国以外的亚洲其他国家和澳洲(江幸福等, 2014b)。

简单重复序列(simple repeat sequence, SSR)又称微卫星 DNA 或者短串联重复序列,一般以 1~6 个碱基为核心序列(罗梅等, 2014)。微卫星标记技术建立以来,以其多态性高、数量多、分布广、共显性遗传等特点(Jarne and Lagoda, 1996)被广泛应用于昆虫的种群遗传多样性研究(Tang *et al*., 2015; Duan *et al*., 2017)。SSR 标记是昆虫种群遗传学研究应用较广泛的分子标记。昆虫种群遗传多样性和遗传结构研究可了解害虫的遗传进化、基因交流、入侵及抗药性等,进而为优化和制定粘虫综合防治策略提供科学依据(Wang *et al*., 2017)。

虽然粘虫属于我国农业生产中的一种历史灾害性害虫,但受其偶发成灾特点的影响,截止目前关于粘虫种群遗传结构的研究较少。郝纪华等(1992)利用同工酶变异证明了粘虫的远距离迁飞特性阻碍了不同地区种群的遗传分化。Jiang 等(2007)首次应用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术从 DNA 分子水平揭示粘虫种群内和种群间的遗传相似性,并从分子遗传变异角度证明了粘虫是一种远距离迁飞昆虫。张国彦(2009)通过构建粘虫的微卫星富集文库,筛选了 8 个微卫星基因座具较好多态性,可用于其种群遗传学研究。陈秀洁(2016)筛选了单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)标记并对粘虫越冬区种群遗传进化及其近缘种进行研究,为粘虫在我国的迁飞轨迹和监测提供依据。陈晓燕等(2017)利用 ISSR(inter-simple sequence repeat)分子标记技术发现云南省 23 个粘虫地理种群的遗传多样性较高,种群间产生了一定程度的遗传分化。

张国彦(2009)筛选的 8 个微卫星基因座虽可用于粘虫种群遗传学研究,但这些位点在我国粘虫种群中能否稳定扩增尚未明确。因此本研究依据已报道的粘虫微卫星标记和本实验室粘虫转录组测序的 SSR 序列,筛选适合我国粘虫种群遗传学研究的微卫星位点,优化这些位点的反应条件和反应体系,分析了不同位点在 7 个地区种群样本的扩增稳定性和多态性,进而筛选出能够稳定扩增且多态性较高的 SSR,以期为进一步研究我国粘虫不同地理种群的遗传多样性及遗传结构奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2016 年 5-8 月,分别在我国陕西、河南、山西的玉米田块采集了 7 个地理种群 200 头粘虫,每头试虫采集距离相隔 20 m 以上,每个种群采集 30 头以上,试虫采集信息见表 1。将田间采集的粘虫幼虫置于无水乙醇中,-20℃保存备用。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 仪器:第三代高速组织研磨机(SEO-Y30,天根)、核酸测定仪(Simplinano)、PCR 仪(Thermo)、电泳仪(JY-300, 北京君意)、ABI3730XL 型 DNA 自动分型仪(Applied Biosystems,美国)、DYY-12 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2.2 试剂:Biospin 昆虫基因组 DNA 提取试剂盒(杭州博日科技有限公司); T6 Super PCR Mix (1.1×)(北京擎科新业生物技术有限公司)。

表 1 粘虫幼虫采集信息

Table 1 Sampling information of *Mythimna separata* larvae

种群代码 Population code	采集地点 Collecting locality	经纬度 Latitude and longitude	采集时间 Collecting date	种群世代* Population generation	样本数 Sample size
HNX	河南信阳固始 Gushi, Xinyang, Henan	115.589°E, 32.193°N	2016.5.3	1	22
HNL	河南洛阳伊川 Yichuan, Luoyang, Henan	112.642°E, 34.401°N	2016.8.3	3	30
SXC	陕西西安长安 Chang'an, Xi'an, Shaanxi	108.954°E, 34.053°N	2016.8.4	3	30
SXH	陕西渭南华阴 Huayin, Weinan, Shaanxi	110.075°E, 34.546°N	2016.8.5	3	30
SXS	陕西咸阳三原 Sanyuan, Xianyang, Shaanxi	108.942°E, 34.615°N	2016.8.5	3	30
SXY	陕西咸阳杨凌 Yangling, Xianyang, Shaanxi	108.037°E, 34.270°N	2016.8.7	3	30
SYC	山西运城芮城 Ruicheng, Yuncheng, Shanxi	110.840°E, 34.694°N	2016.8.8	3	28

* 指当地发生的代次 The generation of local occurrence.

1.3 粘虫基因组 DNA 提取

将单头试虫置于 1.5 mL 离心管中并加入液氮充分研磨,参照 Biospin 昆虫基因组 DNA 提取试剂盒说明书分别提取各头试虫的基因组 DNA。用核酸测定仪检测提取的粘虫基因组 DNA 的浓度以及吸光度值,将检测合格的 DNA 样品置于 -20℃ 冰箱内保存。

1.4 微卫星位点筛选和引物合成

根据南京农业大学(张国彦, 2009)已筛选出的 8 个东方粘虫微卫星标记[从 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中下载东方粘虫的微卫星序列]和本实验室粘虫转录组测序结果中的 SSR 序列设计引物并筛选。

本研究的微卫星扩增参照 Schuelke(2000)和黄建安等(2009)荧光标记 PCR 方法。各位点分别用 3 条引物对全部样本进行 PCR 扩增,第 1 条引物为各微卫星位点 5′端加上 M13(-21)正向引物(5′-TGTAAAACGACGGCCAGT-3′)而形成的上游引物;第 2 条引物为不加任何修饰的各微卫星的反向引物(R);第 3 条引物为 5′端分别带有羧基荧光素(FAM)或六氯-6-荧光素氨基磷酸酯(HEX)标记的 M13(-21)正向引物。所有引物(表 2)均由奥科鼎盛生物科技有限公司(北京)合成。

1.5 PCR 扩增反应体系和反应条件

参照 Schuelke(2000)和段辛乐(2015)的 PCR 条件,并在此基础上优化反应条件,反应体系为 20 μL:2 × T5 Super PCR Mix 10 μL,上游引物(10 μmol/L)0.4 μL,反向引物(10 μmol/L)和 M13 正向引物各 1.6 μL,模板 DNA(20 ~ 50 ng/μL)1.2 μL, ddH_2O 5.2 μL。扩增反应分为两步 PCR 完成,反应程序:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 10 s,各引物特异性退火温度(表 2)15 s,72℃ 延伸 15 s,共 30 个循环;然后 94℃ 变性 15 s,53℃(M13 正向引物退火温度)退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,共 10 个循环;最后 72℃ 补偿延伸 5 min。

1.6 微卫星 PCR 产物检测及基因分型

取 4 μL PCR 产物加样于 1% 琼脂糖胶的上样孔中,以 DL600 DNA Marker 为标准对照,110 V 恒压条件下进行电泳,30 min 后结束电泳,在凝胶成像仪中观察并记录电泳结果。将含有目的条带的 PCR 产物送至西安擎科泽西生物科技有限公司进行微卫星分型检测。用毛细管电泳技术检测被荧光标记的 PCR 产物。利用 ABI3730XL 型 DNA 自动测序仪(Applied Biosystems,美国)结合 GeneMapper v4.0 软件(Applied Biosystems,美国)分析确定微卫星等位基因的基因型。

1.7 数据分析

本研究将分析获得的结果输出入 Excel 表格中,构建粘虫微卫星位点基因型数据库,并根据峰图校正。再用 GenAlEx 6.503(http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html)和 CREATE(http://www.lsc.usgs.gov/CAFL/Ecology/Software.html)软件转换格式后进行如下数据分析:

表 2　粘虫 13 个微卫星位点的特性

Table 2　Characteristics of 13 microsatellite loci in *Mythimna separata*

位点（GenBank 登录号或编号）Locus (GenBank accession no. or code)	引物序列（5′-3′）Primer sequences	重复基序 Repeat motif	退火温度（℃）Anneal temperature	扩增长度（bp）Amplified length
A1-91（FJ896055）	F：AATGGTTTAGATGTGTGTGTG R：CATGACAACTACGAATCCTAC	TG	54	219
A3-34（FJ896056）	F：TGTAGCAGTAGGCACACTTCA R：TGCACCTATCACATACCCGC	TCA	58	240
A3-39（FJ896057）	F：ATCTACACGCTGCTGTTGCG R：AGATCTACGTGACCCCGTCAT	GTT	60	204
A3-81（FJ896058）	F：CCAAGATAAGCAGAATGTGGTG R：TGAATTGTATAGCCGCAGAAAG	TG	57	175
A4-61（FJ896059）	F：TATTGATACAGGGTGTCCGCC R：ACTGCAGGAATGTTTGCGAC	AC	60	235
GTT42（FJ896060）	F：TGTATTTAGATTTAGGTGTGTGTGTG R：TTTAGGTTTACGAGGCGTTTGG	TG	56	178
JGTT29（FJ896061）	F：GCTCGCACAGTCAGTGACAA R：CCGCCAATAACAATTATGAGC	CTG…CCG	58	167
S2GAT5（FJ896062）	F：TATGAACGCCGAGAGCATGA R：AACGATGGAACGGGGTAGTG	CA…AC	55	152
MS1（MG594639）	F：TGATTTATTGGGACTGGTC R：TTGATATTCTTTGGGCAG	CT	48	133
MS2（MG594640）	F：ATGTTTGTTTGATGAGCGC R：CTTGTCCCATTGTAAGCATT	GT	55	149
MS3（MG594641）	F：GCCTTGTGTTATGGTGGTAT R：CGCACACCTATTGTCTTTCTAT	TC	56	153
MS4（MG594642）	F：GGAGTATAGGACCAAAGAGTGCA R：ATCGAATACAGATCATGGTGGC	TCA	58	141
MS11	F：GAGGGATGTGCTTCTACGTATTC R：CTATCCCACAAGTAGCGTCTCCT	TG	58	128

1.7.1　位点多态性：GenAlEx 6.503 和 Arlequin 3.5（http：//cmpg. unibe. ch/software/arlequin35/）软件计算各位点在粘虫种群中的等位基因数（*Na*）、观测杂合度（*Ho*）、期望杂合度（*He*）和近交系数（*Fis*）等指标。FSTAT Version 2.9.3.2（https：//www2. unil. ch/popgen/softwares/fstat. htm）计算等位基因丰富度（*Ar*），PIC-Calc 0.6（http：//www. bio-soft. net/dna/pic. htm）软件计算多态信息含量（*PIC*）。

1.7.2　遗传多样性分析：FREENA（http：//www1. montpellier. inra. fr/CBGP/software/FreeNA/）软件检测各位点无效等位基因并计算无效等位基因频率。Micro-Checker 2.2.3 软件（http：//www. microchecker. hull. ac. uk/）检测是否存在大量等位基因脱失现象（stuttering and large allele dropout）并分析无效等位基因存在的可能原因。“Genepop on the Web”（http：//genepop. curtin. edu. au/）进行各位点的哈迪-温伯格平衡 *P* 值的无偏估测和连锁不平衡检测。利用 Arlequin 3.5 和 POPGENE Version 1.32（https：//sites. ualberta. ca/～fyeh/popgene_download. html）等软件计算粘虫不同地理种群的遗传多样性参数。

1.7.3　种群间遗传分化和基因流：利用 Arlequin 3.5 软件计算粘虫不同地理种群间的遗传分化程度。再根据基因流 $Nm = [(1/Fst) - 1]/4$，确定两两种群间的基因交流情况。

2　结果

2.1　粘虫 SSR 位点的扩增稳定性

对所选取的 13 个微卫星位点进行 PCR 扩增，其中，A1-91，A3-81，JGTT29，MS1，MS2，MS3，MS4 和 MS11 位点在不同地理种群中均能稳定扩

增。A3-34，A3-39，A4-61 和 S2GAT5 扩增效率为0；GTT42 位点的仅在 SXS，SXH 和 SYC 种群的少数样本中能扩增；将稳定扩增的位点经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)检测，其中 MS11 位点不具多态性，其他 7 个 SSR 位点均表现不同程度的多态性，可用于我国粘虫种群遗传学研究。7 个 SSR 位点电泳检测如图 1。

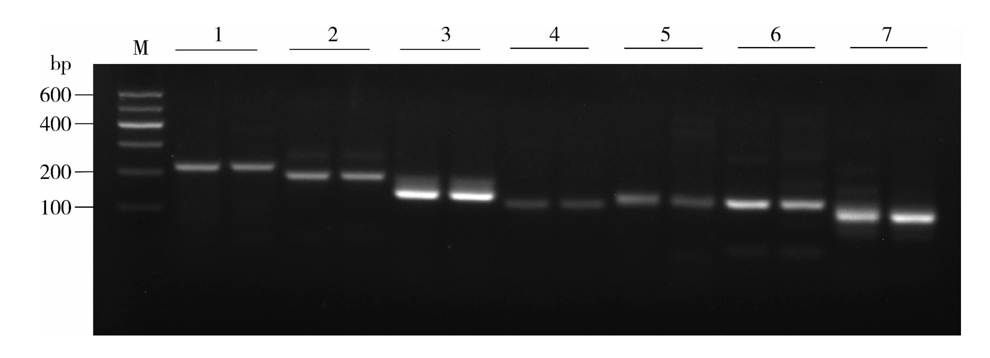


图 1 粘虫 7 个 SSR 位点扩增产物的电泳检测

Fig. 1 The electrophoresis result of PCR amplification products of seven SSR loci in *Mythimna separata*

M：DL600 Marker；1 – 7：分别为能稳定扩增的 SSR 位点 A1-91，A3-81，JGTT29，MS1，MS2，MS3 和 MS4（SSR loci A1-91，A3-81，JGTT29，MS1，MS2，MS3 and MS4，which could be amplified stably，respectively）．每个位点的两条带分别为陕西长安(SXC)和河南信阳(HNX)种群的个体扩增条带。Two straps are amplified fragment from populations from Chang'an，Shaanxi（SXC）and Xinyang，Henan（HNX）samples in every locus，respectively.

2.2 粘虫 7 个微卫星位点的多态性分析

所选取的 7 个 SSR 位点在我国 7 个粘虫地理种群中的多态性特点如表 3。7 个位点共检测到 109 个等位基因，其中位点 A3-81 的等位基因数最多(26)，MS1 位点的基因数最少(5)；各位点的有效等位基因数(*Ne*)为 2.434 ~ 7.123，Shannon 信息指数(*I*)为 1.086 ~ 2.150；等位基因丰富度(*Ar*)为 4.167 ~ 12.402，观测杂合度(*Ho*)为 0.548 ~ 0.744，期望杂合度(*He*)为 0.585 ~ 0.859，表明各位点均具有较高的多态性。Nei's 基因多样性指数平均为 0.769；其中，MS1 和 MS2 位点观测杂合度高于期望杂合度，表现出杂合度过剩；其他位点都表现为杂合度缺失。各位点的多态信息含量(*PIC*)为 0.547 ~ 0.884，各位点 *PIC* 均大于 0.5，表明这些位点具较高的多态性，能提供较多的遗传信息(Botstein *et al*.，1980)。

表 3 粘虫 7 个微卫星位点的多态性特征

Table 3 Polymorphism of seven microsatellite loci of *Mythimna separata*

位点 Locus	*Na*	*Ne*	*I*	*PIC*	*Ar*	*Ho*	*He*	*N*
A1-91	18	4.891	1.837	0.800	10.813	0.571	0.790	0.809
A3-81	26	5.683	1.930	0.832	12.402	0.548	0.818	0.839
JGTT29	22	7.123	2.150	0.884	12.364	0.709	0.859	0.877
MS1	5	2.434	1.086	0.547	4.167	0.615	0.585	0.595
MS2	10	3.412	1.352	0.661	6.565	0.744	0.694	0.706
MS3	16	5.061	1.876	0.794	9.856	0.704	0.799	0.815
MS4	12	3.772	1.640	0.718	8.474	0.587	0.724	0.740
平均值 Average	15.6	4.625	1.696	0.748	9.234	0.640	0.752	0.769

Na：等位基因数 Number of alleles；*Ne*：有效等位基因数 Effective number of alleles；*I*：Shannon's 指数 Shannon's information index；*PIC*：多态信息含量 Polymorphic information content；*Ar*：等位基因丰富度 Allelic richness；*Ho*：观测杂合度 Observed heterozygosity；*He*：期望杂合度 Expected heterozygosity；*N*：Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity. 表 7 同 The same for Table 7.

2.3 7 个微卫星位点在不同粘虫种群中的无效等位基因频率

基于 Dempster 等(1997)的 EM 法则评估了 7 个多态性位点的无效等位基因频率(表 4)，各位点均存在无效等位基因，无效等位基因频率为 0.0276 ~ 0.1664，无效等位基因频率在 A3-81 位点最高(0.1664)，A1-91 位点次之。Micro-Checker 软件检测无影子带和大量等位基因脱失现象，无效等位基

因存在可能是纯合子过剩引起。

2.4 哈迪-温伯格平衡检验

利用在线 Genepop 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验(马尔科夫链模型),判断 7 个 SSR 位点是否处于随机状态。由表 5 可知,各位点均偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$);各种群在 A1-91, A3-81 和 JGTT29 位点均极显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.01$);陕西华阴(SXH)和陕西杨凌(SXY)种群在各位点均偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$ 或 $P<0.01$);同时对各地理种群的杂合子进行正合检验,发现偏离哈迪-温伯格平衡的种群基本都表现出杂合子缺失情况。

表 4　7 个微卫星位点在不同粘虫种群中的无效等位基因频率

Table 4　Null allele frequency in *Mythimna separata* populations at each of seven microsatellite loci

位点 Locus	无效等位基因存在情况 Null allele present	无效等位基因频率 Null allele frequency
A1-91	是 Yes	0.1359
A3-81	是 Yes	0.1664
JGTT29	是 Yes	0.0945
MS1	是 Yes	0.0293
MS2	是 Yes	0.0276
MS3	是 Yes	0.0777
MS4	是 Yes	0.0949

表 5　7 个 SSR 位点在 7 个粘虫地理种群中的哈迪-温伯格平衡 *P* 值

Table 5　*P* value of Hardy-Weinberg equilibrium exact test for seven geographical populations of *Mythimna separata* based on seven microsatellite loci

位点 Locus	种群代码 Population code							
	HNX	HNL	SXC	SXH	SXS	SXY	SYC	多种群 Multi-population
A1-91	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **
A3-81	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **
JGTT29	0.0000 **	0.0070 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0037 **	0.0378 *	0.0000 **	0.0000 **
MS1	0.0022 **	0.0000 **	0.0712	0.0000 **	0.1582	0.0179 *	0.0016 **	0.0000 **
MS2	0.1846	0.1208	0.4533	0.0464 *	0.4506	0.0091 **	0.0186 *	0.0000 **
MS3	0.0728	0.0000 **	0.0076 **	0.0008 **	0.0938	0.0000 **	0.1538	0.0000 **
MS4	0.0011 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **
多位点 Multi-loci	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 * *

种群代码见表 1。星号为显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$);双星号为极显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.01$)。For population code see Table 1. The asterisk indicates significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$), and the double asterisk indicates extremely significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.01$).

2.5 粘虫种群在各成对位点间基因型连锁情况

利用 Fisher's 方法检测了能稳定扩增的 7 个多态性微卫星位点的基因型连锁不平衡情况,结果表明全部成对位点不存在连锁不平衡(表 6),为独立遗传。为进一步验证各成对位点的连锁不平衡情况,用 Arlequin 3.5 软件中的基因型连锁不平衡检测程序对所有位点进行随机比较发现,在种群的 147 个成对位点中,有 18 个成对位点存在基因连锁不平衡,尽管连锁不平衡位点分布较多,但所有位点中均未显示某一位点全部连锁不平衡的现象。

2.6 7 个粘虫地理种群的遗传多样性

利用 GenAlEx, POPGENE 和 FSTAT 软件对粘虫不同地理种群的所有样本微卫星数据进行遗传多样性统计(表 7)。结果显示,群体水平上多态性位点百分数为 100%。等位基因数(Na)为 7.6 ~ 9.0,有效等位基因数(Ne)为 4.092 ~ 5.006, Shannon's 指数(I)为 1.595 ~ 1.770,等位基因丰富度(Ar)均大于 7.5;观测杂合度(Ho)在 0.587 ~ 0.692 之间,期望杂合度(He)在 0.724 ~ 0.777 之间,$Fis>0$,即各种群中可能存在杂合子缺失(王永模等, 2007)。但总体上,7 个粘虫地理种群的遗传多样性较高,说明河南、陕西和山西省 7 个地区的粘虫对环境变化有较强的适应能力。

2.7 粘虫不同地理种群的遗传分化和基因流分析

粘虫不同地理种群中两两种群间的 Fst 值表明,SXC 与 SYC 种群间遗传分化值最大,但分化水平不高;其次,其他大多数粘虫种群间遗传分化很低。粘虫地理种群间基因流分析见表 8。$Nm>4$,说明不同粘虫种群间基因流很强;SXS 与 SXH 种群交流最强,其次是与 SYC 种群;其他种群间基因交

表 6 7 个粘虫地理种群在各成对位点间基因型连锁不平衡分析

Table 6 Analysis of genotypic linkage disequilibrium of pairwise loci among seven geographical populations of *Mythimna separata*

成对位点 Pairwise loci	卡方值 *Chi*-square value	自由度 *df*	*P* 值 *P*-value
A1-91/A3-81	20.010	14	0.130
A1-91/JGTT29	7.643	14	0.907
A3-81/JGTT29	13.439	14	0.492
A1-91/MS1	17.502	14	0.230
A3-81/MS1	19.644	14	0.142
JGTT29/MS1	11.944	14	0.611
A1-91/MS2	18.452	14	0.187
A3-81/MS2	13.132	14	0.516
JGTT29/MS2	6.113	14	0.964
MS1/MS2	3.866	14	0.996
A1-91/MS3	8.536	14	0.860
A3-81/MS3	4.815	14	0.988
JGTT29/MS3	7.519	14	0.913
MS1/MS3	5.158	14	0.983
MS2/MS3	17.286	14	0.241
A1-91/MS4	6.195	14	0.961
A3-81/MS4	10.630	14	0.715
JGTT29/MS4	10.995	14	0.686
MS1/MS4	11.661	14	0.634
MS2/MS4	11.876	14	0.616
MS3/MS4	7.160	14	0.928

$P<0.05$ 表明两个位点间可能存在连锁不平衡。$P<0.05$ represents the possibility of linkage disequilibrium existing in pairwise loci.

流相对频繁。所有群体间 $Nm>1$，表明不存在由遗传漂变引起的变异（Slatkin, 1985）。

3 结论与讨论

微卫星标记在种群遗传学研究中具有重要意义。但新微卫星位点的开发费用高，工作量大，利用同种或近缘种已报道的微卫星来开展其他昆虫遗传分化的相关研究是一种有效的途径（Kim *et al*., 2008）。本研究利用张国彦（2009）已报道的 8 个 SSR 位点，但仅其中 3 个位点能在粘虫种群中稳定扩增且具多态性，5 个位点尚不能扩增或者反应条件不稳定。尽管转录组中 EST-SSR 标记的多态性比基因组 SSR 要低，但其具有基因组 SSR 不具备的优越性，可很好地用于物种种群遗传学研究（魏丹丹等，2014）。虽然微卫星位点侧翼序列在种内高度保守，但有研究发现，同一物种的微卫星标记在不同种群个体中具有不同的扩增稳定性与多态性（郑燕等，2014；段辛乐，2015）。

等位基因数和杂合度与 SSR 位点的多态性成正相关。遗传杂合度能反映不同地理种群在多个基因位点上的遗传变异程度，多态信息含量（*PIC*）是衡量微卫星位点多态性的重要指标。本研究所筛选的 7 个 SSR 位点平均有效等位基因数为 4.625，期望杂

表 7 基于 7 个 SSR 位点的 7 个粘虫地理种群遗传多样性

Table 7 Genetic diversity for seven geographical populations of *Mythimna separata* investigated with seven microsatellite loci

种群代码 Population code	*Na*	*Ne*	*I*	*Ar*	*Ho*	*He*	*Fis*
HNX	7.6	4.805	1.702	7.519	0.672	0.766	0.146
HNL	8.1	4.092	1.595	7.585	0.587	0.724	0.206
SXC	9.0	4.423	1.652	8.212	0.621	0.725	0.159
SXH	8.6	5.006	1.770	8.069	0.632	0.777	0.202
SXS	8.7	4.775	1.748	8.213	0.662	0.763	0.149
SXY	8.1	4.540	1.653	7.652	0.612	0.743	0.192
SYC	9.0	4.734	1.749	8.473	0.692	0.771	0.121

Na: 等位基因数 Number of alleles; *Fis*: 近交系数 Inbreeding index. 种群代码见表 1。For population code see Table 1.

表 8 7 个粘虫地理种群间成对固定系数（左下角）及基因流分析（右上角）

Table 8 Population pairwise *Fst* (below diagonal) and gene flow (above diagonal) among seven geographical populations of *Mythimna separata*

种群代码 Population code	HNX	HNL	SXC	SXH	SXS	SXY	SYC
HNX		8.989	10.325	15.583	21.757	10.466	15.395
HNL	0.027		29.127	14.810	18.819	16.574	12.017
SXC	0.024	0.009		13.547	14.596	9.417	8.691
SXH	0.016	0.017	0.018		64.517	18.092	27.967
SXS	0.011	0.013	0.017	0.004		31.396	49.255
SXY	0.023	0.015	0.026	0.014	0.008		35.670
SYC	0.016	0.020	0.028	0.009	0.005	0.007	

种群代码见表 1。For population code see Table 1.

合度(He)为0.585～0.859,各位点 $PIC > 0.5$,说明7个位点均具有较高的多态性,可为粘虫种群遗传多样性研究提供充分的遗传信息。

无效等位基因的存在与潜在影响是其最大缺陷之一,其在昆虫中出现的频率明显高于其他物种(Lehmann *et al*., 1996；文亚峰等, 2013)。原则上,在每个样本的微卫星序列侧翼区可能携带一个无效等位基因,但只有少数的实证研究(Dakin and Avise, 2004)。本研究筛选的7个SSR标记中都存在无效等位基因,无效等位基因频率范围为0.0276～0.1664。各位点无效等位基因频率较高并不是影子带和大量等位基因脱失引起。各种群杂合子缺失,是无效等位基因的潜在来源之一。许多研究认为无效等位基因频率小于0.2时,不会影响数据的准确分析,研究物种的遗传多样性和遗传结构影响较小(Dakin and Avise, 2004; Chapuis and Estoup, 2007)。也有研究表明,一定程度的SSR无效等位基因频率在鳞翅目害虫中广泛存在,但并不影响这些位点在相关研究中的应用(Torriani *et al*., 2010; Kirk *et al*., 2013)。

哈迪-温伯格平衡是在理想状态下,各等位基因的频率和基因型频率在遗传中稳定不变,即保持着基因平衡。等位基因的杂合子缺失或过剩都能导致种群偏离哈迪-温伯格平衡(段辛乐, 2015)。本研究中粘虫不同地理种群7个多态性SSR位点上均偏离哈迪-温伯格平衡,对各地理种群的杂合子进行正合检验,发现偏离哈迪-温伯格平衡的种群基本都表现出杂合子缺失的情况,这与郑燕等(2014)的结果相同。

连锁不平衡是指群体内不同位点等位基因间的非随机性组合的关系。连锁不平衡的原因可能包括交配体系、自然选择、突变和遗传漂变以及基因流等(郑燕等, 2014)。种群中连锁不平衡位点分布较多,但所有位点中均未显示某一位点全部连锁不平衡的现象。表明筛选的各位点在我国粘虫基因组中分布均匀,世代传递过程中相对独立。

粘虫的迁飞行为可能导致我国各地发生的粘虫种群基因交流频率很高,并无明显的地理种群划分(Jiang *et al*., 2007)。本研究中粘虫7个种群间发生了不同程度的基因交流,多数群体间不存在基因交流阻碍,这与粘虫为典型迁飞性害虫的事实相符。另外,不同种群中杂合度缺失,与无效等位基因频率较高的结果相符。

基于上述微卫星位点多态性指标分析,本研究筛选的7个微卫星位点A1-91, A3-81, JGTT29, MS1, MS2, MS3和MS4在我国粘虫种群中变异程度较高,能为粘虫遗传多样性研究提供充分的遗传信息,可进一步用于我国东西部粘虫种群的遗传分析研究。

参考文献(References)

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32(3): 314.

Chapuis MP, Estoup A, 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.*, 24(3): 621–631.

Chen XJ, 2016. Genetic Evolution and Related Species Research of *Mythimna separata* in the Overwintering Range. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [陈秀洁, 2016. 粘虫越冬区种群遗传进化及其近缘种研究. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]

Chen XY, Li YH, Hao RS, Ke R, Li YC, Zhao SP, Gui FR, 2017. Genetic diversity of *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in Yunnan province. *J. Yunnan Agric. Univ.* (*Nat. Sci.*), 32(2): 204–211. [陈晓燕, 李亚红, 郝若诗, 可芮, 李永川, 赵世平, 桂富荣, 2017. 云南省粘虫的遗传多样性. 云南农业大学学报(自然科学), 32(2): 204–211]

Cheng DF, Zhao ZH, 2016. Analysis of the oriental armyworm outbreak in part areas of China and suggestions of control. *Seed Sci. Technol.*, 34(10): 89–90. [程登发, 赵中华, 2016. 我国部分地区黏虫暴发原因分析与对策建议. 种子科技, 34(10): 89–90]

Dakin EE, Avise JC, 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5): 504–509.

Dempster AP, Laird NM, Rubin DB, 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 39(1): 1–38.

Duan XL, 2015. Genetic Diversity and Genetic Structure of Bird Cherry-oat Aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) in China and Inductive Effect of Pesticide. PhD Dissertation, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi. [段辛乐, 2015. 我国禾谷缢管蚜种群遗传多样性和遗传结构及农药对其胁迫效应研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文]

Duan XL, Peng X, Qiao XF, Chen MH, 2017. Life cycle and population genetics of bird cherry-oat aphids *Rhopalosiphum padi* in China: an important pest on wheat crops. *J. Pest Sci.*, 90(1): 103–116.

Hao JH, Li SW, Lin CS, 1992. Isozyme variation in different local populations of *Mythimna separata*. *Acta Entomol. Sin.*, 35(1): 33–39. [郝纪华, 李绍文, 林昌善, 1992. 不同地区粘虫群体的同工酶变异. 昆虫学报, 35(1): 33–39]

Huang JA, Li J, Tan YP, Liu SQ, Li Q, Liu ZH, 2009. Tea plant microsatellite genotyping by capillary electrophoresis with four-color fluorescent detection technique. *Life Sci. Res.*, 13(3): 251–257. [黄建安, 李娟, 谭月萍, 刘硕谦, 李勤, 刘仲华, 2009. 毛细管

电泳四色荧光检测法分析茶树 SSR 标记. 生命科学研究, 13(3): 251-257]

Jarne P, Lagoda PJL, 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11(10): 424-429.

Jiang XF, Jiang YY, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, 2014a. Investigation and monitoring of overwintering and migrant populations, and the larval occurrence of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(4): 1114-1119. [江幸福, 姜玉英, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014a. 粘虫越冬迁飞与危害的调查及监测技术. 应用昆虫学报, 51(4): 1114-1119]

Jiang XF, Luo LZ, Zhang L, 2007. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) geographic and melanic laboratory populations in China. *J. Econ. Entomol.*, 100(5): 1525-1532.

Jiang XF, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, 2014b. Novel features, occurrence trends and economic impact of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(6): 1444-1449. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014b. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析. 应用昆虫学报, 51(6): 1444-1449]

Jiang YY, Li CG, Zeng J, Liu J, 2014. Population dynamics of the armyworm in China: a review of the past 60 years' research. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(4): 890-898. [姜玉英, 李春广, 曾娟, 刘杰, 2014. 我国粘虫发生概况: 60 年回顾. 应用昆虫学报, 51(4): 890-898]

Kim MS, Jeong EG, Ahn CH, Kim SS, Lee SH, Yoo N, 2008. Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Hum. Pathol.*, 39(7): 1059-1063.

Kirk H, Dorn S, Mazzi D, 2013. Molecular genetics and genomics generate new insights into invertebrate pest invasions. *Evol. Appl.*, 6(5): 842-856.

Lehmann T, Hawley WA, Kamau L, Fontenille D, Sinard F, Collins FH, 1996. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*, 77(2): 192-200.

Li GB, Wang HX, Hu WX, 1964. The hypothesis of seasonal migration-damage and mark-recapture test. *Acta Phytophy. Sin.*, 3(2): 101-109. [李光博, 王恒祥, 胡文绣, 1964. 粘虫季节性迁飞为害假说及标记回收试验. 植物保护学报, 3(2): 101-109]

Luo M, Zhang H, Bin SY, Lin JT, 2014. High-throughput discovery of SSR genetic markers in the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae), from its transcriptome database. *Acta Entomol. Sin.*, 57(4): 395-400. [罗梅, 张鹤, 宾淑英, 林进添, 2014. 基于转录组数据高通量发掘扶桑绵粉蚧微卫星引物. 昆虫学报, 57(4): 395-400]

Schuelke M, 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.*, 18(2): 233-234.

Slatkin M, 1985. Gene flow in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 16(1): 393-430.

Tang XT, Tao HH, Du YZ, 2015. Microsatellite-based analysis of the genetic structure and diversity of *Aleurocanthus spiniferus* (Hemiptera: Aleyrodidae) from tea plants in China. *Gene*, 560(1): 107-113.

Torriani MVG, Mazzi D, Hein S, Dorn S, 2010. Structured populations of the oriental fruit moth in an agricultural ecosystem. *Mol. Ecol.*, 19(13): 2651-2660.

Wang XY, Yang XM, Lu B, Zhou LH, Wu KM, 2017. Genetic variation and phylogeographic structure of the cotton aphid, *Aphis gossypii*, based on mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Sci. Rep.*, 7(1): 1920.

Wang YM, Shen ZR, Gao LW, 2007. Microsatellite markers and their application in aphid population biology. *Acta Entomol. Sin.*, 50(6): 621-627. [王永模, 沈佐锐, 高灵旺, 2007. 微卫星标记及其在蚜虫种群生物学研究中的应用. 昆虫学报, 50(6): 621-627]

Wei DD, Shi JX, Zhang XX, Chen SC, Wei D, Wang JJ, 2014. Analysis of microsatellite loci from *Bactrocera dorsalis* based on transcriptome dataset. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 25(6): 1799-1805. [魏丹丹, 石俊霞, 张夏瑄, 陈世春, 魏冬, 王进军, 2014. 基于转录组数据的桔小实蝇微卫星位点信息分析. 应用生态学报, 25(6): 1799-1805]

Wen YF, Uchiyama K, Han WJ, Ueno S, Xie WD, Xu GB, Tsumura Y, 2013. Null alleles in microsatellite markers. *Biodiv. Sci.*, 21(1): 117-126. [文亚峰, Uchiyama K, 韩文军, Ueno S, 谢伟东, 徐刚标, Tsumura Y, 2013. 微卫星标记中的无效等位基因. 生物多样性, 21(1): 117-126]

Zeng J, Jiang YY, Liu J, 2013. Analysis of the armyworm outbreak in 2012 and suggestions of monitoring and forecasting. *Plant Prot.*, 39(2): 117-121. [曾娟, 姜玉英, 刘杰, 2013. 2012 年黏虫暴发特点分析与监测预警建议. 植物保护, 39(2): 117-121]

Zhang GY, 2009. The Construction of Microsatellite-enriched Library and Genetic Markers Screening of the Oriental Armyworm *Pseudaletia separata* (Walker). PhD Dissertation, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [张国彦, 2009. 东方粘虫微卫星富集文库的构建与遗传标记筛选. 南京: 南京农业大学博士学位论文]

Zheng Y, Wang K, Li YT, Qiao XF, Chen MH, 2014. Amplification stability and polymorphism of microsatellite loci in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in China. *Acta Entomol. Sin.*, 57(11): 1335-1342. [郑燕, 王康, 李玉婷, 乔宪凤, 陈茂华, 2014. 梨小食心虫微卫星标记的扩增稳定性及多态性分析. 昆虫学报, 57(11): 1335-1342]

Zhou JH, Yu ZH, Wu JK, Liu AY, Hui JT, Zheng YL, Wu JX, 2017. Population dynamics of *Mythimna separata* (Walker) and its primary influence factors in the fall in Central Shaanxi area. *China Plant Prot.*, 37(6): 36-40, 48. [周靖华, 于志浩, 武建宽, 刘艾英, 惠军涛, 郑余良, 仵均祥, 2017. 陕西关中地区秋季黏虫发生新动态和影响因素分析. 中国植保导刊, 37(6): 36-40, 48]

(责任编辑: 马丽萍)